

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06098800 A**

(43) Date of publication of application: **12.04.94**

(51) Int. Cl

**C12Q 1/68**  
**C12Q 1/68**  
**C12N 15/11**  
**C12Q 1/04**  
**/(C12Q 1/04 , C12R 1:01 )**

(21) Application number: **04274830**

(22) Date of filing: **21.09.92**

(71) Applicant: **TAKARA SHUZO CO LTD**

(72) Inventor: **NAKAGAWA TOMOKO**  
**UEMORI TAKASHI**  
**ASADA KIYOZOU**  
**KATOU IKUNOSHIN**  
**HARASAWA AKIRA**

**(54) METHOD FOR DETECTING ACHOLEPLASMA**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a method for detecting Acholeplasma and a kit used therefor by clarifying a gene specific to Acholeplasma.

**CONSTITUTION:** The objective method for detecting Acholeplasma is to detect a gene of spacer region between a gene coding 16SrRNA of Acholeplasma and a gene coding 23SrRNA. The objective gene of spacer

region. The objective kit for detecting Acholeplasma contains a specific kit for amplifying the gene of spacer region. Acholeplasma can rapidly be detected in high sensitivity by using this gene of spacer region.

**COPYRIGHT:** (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-98800

(43)公開日 平成6年(1994)4月12日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A Z	7823-4B		
	A	7823-4B		
C 1 2 N 15/11				
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
		8931-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 3(全 9 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-274830	(71)出願人	591038141 寶酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地
(22)出願日	平成4年(1992)9月21日	(72)発明者	中川 朋子 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造 株式会社中央研究所内
		(72)発明者	上森 隆司 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造 株式会社中央研究所内
		(72)発明者	浅田 起代蔵 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造 株式会社中央研究所内
		(74)代理人	弁理士 中本 宏 (外2名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アコレプラズマの検出方法

(57)【要約】

【目的】 アコレプラズマに特異的な遺伝子を明らかにし、その検出方法及びそれに用いるキットを提供する。

【構成】 アコレプラズマの16SrRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間にあるスペーサー領域の遺伝子を検出するアコレプラズマの検出方法。該スペーサー領域の遺伝子。該スペーサー領域の遺伝子を増幅させるための特定のプライマーを含有するアコレプラズマ検出キット。

【効果】 アコレプラズマを、迅速、かつ高感度に検出することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アコレプラズマの検出方法において、アコレプラズマの16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間にあるスペーサー領域の遺伝子を検出することを特徴とするアコレプラズマの検出方法。

【請求項2】 請求項1記載のスペーサー領域の遺伝子。

【請求項3】 請求項1記載の方法を用いて検出を行うための検出キットであって、アコレプラズマの請求項2記載のスペーサー領域の遺伝子を増幅させるための特定のプライマーを含有していることを特徴とするアコレプラズマ検出キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アコレプラズマ (Acholeplasma) の検出方法に関し、更に詳細には16S/23S rRNAスペーサー領域の遺伝子領域を用いた迅速かつ高感度なアコレプラズマの検出方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】アコレプラズマはマイコプラズマ (Mycoplasma) と同じモリクセス (Mollicutes) 綱に属する細胞壁を欠如する原核生物であり、栄養要求性の違いにより、マイコプラズマと分類学的に区別される。アコレプラズマは、1936年、下水及び堆肥から分離されたのが最初で、その後、各種動物の上部気道あるいは生殖器などに正常フローラとして存在していることが明らかにされている【奥水ら、「マイコプラズマとその実験法」近代出版(1988)】。アコレプラズマは、マイコプラズマと同様に、組織培養中の汚染やワクチン等の生物製剤への混入が問題となっており、汚染マイコプラズマと同じ方法で検出、除去する方法が研究されている。更に、実験動物は医学・生物学の研究の上で果す重要性が近年高まり、その品質についても高度なものが要求されてきており、マウス、ラット等の実験動物のコロニーを維持、管理する上でもアコレプラズマ汚染の診断と予防はマイコプラズマと同様に重要な項目となってきた。現在アコレプラズマの検出方法としてはマイコプラズマと同様に、分離培養方法、DNA蛍光染色方法、生化学的方法、免疫学的方法などが開発されており、通常利用されているが、その操作は煩雑であり、簡便な方法ではない。一方、近年種々の遺伝子診断方法が開発されてきており、特にPCR法【メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology)、第155巻、第335～350頁(1987)】が微生物やウイルスの迅速かつ高感度な検出法として利用されている。例えば、特開平2-106354号公報には、マイコプラズマに特異的な遺伝子領域をPCR法で増幅し、マイコプラズマを迅速かつ高感度に検出する方法が記載されている。しかしながら、アコレプラズマに特異的な遺伝子は

知られていない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】つまり、アコレプラズマに特異的な遺伝子を特定できれば、該遺伝子を用いて迅速かつ高感度な検出法を確立でき、前出のマイコプラズマの検出と平行して行えば、組織培養等の管理が更に確実なものとなる。すなわち、本発明の目的はアコレプラズマに特異的な遺伝子を明らかにし、その検出方法及びそれに用いるキットを提供することにある。

## 10 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はアコレプラズマの検出方法に関し、アコレプラズマの16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間にあるスペーサー領域の遺伝子を検出することを特徴とする。また、本発明の第2の発明は、第1の発明のスペーサー領域の遺伝子に関する。また、本発明の第3の発明は、第1の方法を用いて検出を行うための検出キットであって、アコレプラズマのスペーサー領域の遺伝子を増幅させるための特定のプライマーを含有していることを特徴とする。

20

【0005】アコレプラズマのrRNAをコードするDNAは、16S rRNA-スペーサー領域-23S rRNA-スペーサー領域-5S rRNAの各DNA配列で構成されている。本発明者らは前記課題を解決するためにアコレプラズマのrRNAをコードしているDNA配列の一部、すなわち16S rRNA-スペーサー領域-23S rRNAをコードしている遺伝子の塩基配列の一部を明らかにし、次にアコレプラズマに特異的な塩基配列を見出した。次に、遺伝子検出方法として現在最も高感度で簡便なPCR法を行うために、アコレプラズマに特異的な遺伝子の特定領域をPCR法で増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。次に、アコレプラズマDNAを鋳型としてPCR法を行い、アコレプラズマDNAの特定領域が効率よく増幅され、アコレプラズマが特異的に検出できることを見出し、本発明を完成した。

30

【0006】以下、順を追って本発明を具体的に説明する。本発明に用いるアコレプラズマとしては例えばアコレプラズマ ライドラウイイ (A. laidlawii) PG8株 (東京大学医学部動物実験施設より入手可能) がある。アコレプラズマの検出に用いられるrRNAをコードする遺伝子の塩基配列としては、アコレプラズマに特異的な配列であれば良いが、例えば16S rRNA-スペーサー領域-23S rRNAをコードする塩基配列より特異的な配列を見出せば良い。16S rRNA及び23S rRNAをコードする遺伝子は微生物間でよく保存されていることが知られている (特願平4-113154号明細書)。

## 【0007】

## 【表1】

50

表 1

R16-2の配列: 5' -G T G C G G C T G G A T C A C C T C C T-3'	
ラクトバチルス カゼイ (Lactobacillus casei)	N N N N N N N N - - - - -
バチルス ズブチリス (Bacillus subtilis)	- - - - -
エシェリヒア コリ (Escherichia coli)	C - - - - - T - - - - -
マイコバクテリウム ボビス (Mycobacterium bovis)	- - - - -
ハロバクテリウム ハロビ ウム(Halobacterium halobium)	C - - - - -
マイコプラズマ カプリコ ラム(Mycoplasma capricolum)	- - - - - A - - - - -
シュードモナス アエルギ ノサ(Pseudomonas aeruginosa)	C - - - - -
サーマス サーモフィラス (Thermus thermophilus)	- - - - -
ハロコッカス モールアエ (Halococcus morrhuae)	C - - - - -
ストレプトミセス リビダ ンス(Streptomyces lividans)	- - - - -
ヘリオバクテリウム クロ ラム(Heliobacterium chlorum)	- - - - -
フラボバクテリウム ヘパリ ナム(Flavobacterium heparinum)	- N N N N N N N - - - - -

【0008】

【表2】

## 表 2

R23-1Rの配列: 3'-<sup>C</sup>CTTAC<sup>G</sup>CGAACCGTGATCCTC-5'

R23-1Rの相補発明: 5'-<sup>G</sup>GAATGG<sup>C</sup>CTTGGCACTAGGAG-3'

バチリス	ズブチリス	- G - - - C - - - - -
エシェリヒア	コリ	- G - - - C - C - - - - G - C A - - -
マイコバクテリウム	ボビス	- G - - - C - - - - - T C G A - - -
ハロバクテリウム	ハロビウム	- G - - A G - - C - - - T - G G A T G C
マイコプラズマ	カブリコラム	- A - - - C - - - - - A - A A T - - -
シュードモナス	アエルギノサ	- G - - - C - - - - - G - C A - - -
サーマス	サーモフィラス	- G - - - C - - C - - - - C C * - - -
ハロコッカス	モールアエ	- A - - A G - - - - - G - C A - - -

【0009】上記表1及び表2は原核生物rRNA遺伝子の保存されている塩基配列、及びそれらから選定したプライマーの塩基配列を示すものであり、表1は16SrRNA遺伝子の、表2は23SrRNA遺伝子の、それぞれ保存されている塩基配列、及びそれらから選定したプライマーの塩基配列を表す。表1及び表2ではいずれも、保存されている塩基をーで、異なる塩基をその塩基の記号で、欠損している塩基を\*で、同定されていない塩基をNで示した。

【0010】例えば、配列表の配列番号1で表されるR16-2プライマーと配列表の配列番号2で表されるR23-1Rプライマーの組合せで、アコレプラズマのスペーサー領域をPCR法で増幅することができる。

【0011】このプライマー対はDNA合成機により合成でき、HPLCにて精製できる。このプライマー対を用い、アコレプラズマのDNAを鋳型としてPCR反応を行い、塩基配列決定用のDNAの増幅を行う。PCR法についてはタック-ポリメラーゼ (Taq-polymerase) を含む遺伝子増幅キット及び自動遺伝子増幅装置が宝酒造社から市販されており、これと前述のプライマー対を用い、アコレプラズマDNAの増幅反応を行う。

【0012】PCR法としては、酵素として、例えば耐熱性タック-ポリメラーゼを用い、DNAの変性 (94℃) の工程、プライマーDNAのアニーリング (55℃) の工程、DNA相補鎖の酵素的合成 (72℃) の工程より成る温度サイクルを30回繰返し、目的遺伝子を

\* 増幅する。この場合アニーリング温度、温度サイクル回数は、鋳型DNAとプライマーDNAの融解温度 (Tm)、鋳型、プライマー間の相同性を考慮して適宜選定される。

【0013】次に増幅されたDNAの塩基配列を決定する。PCR法によって増幅されたDNAの塩基配列決定は、一旦DNAをM13又はpUC等のファージ又はプラスミドベクターにクローニングする方法、又はこのクローニングのステップを省略し、直接PCR増幅DNAを用いる方法 [ダイレクト シークエンス (Direct Sequence) 法] で決定することができる。タック-ポリメラーゼを用いたイン ビトロ (in vitro) DNA合成の際に起こりうるミスインコーポレーションに起因するDNA配列の読み間違いを防ぐためにも、また時間、費用を制約するためにも、ダイレクト シークエンス法が有利である。

【0014】本発明者らは、アコレプラズマDNAを鋳型として前述のR16-2プライマーとR23-1Rプライマーを用いてPCRを行った。その結果、約440bpと約230bpの断片が増幅され、それぞれをUL、USと命名した。次にこれらの断片の塩基配列を決定した。配列表の配列番号3にULの塩基配列を、配列表の配列番号4にUSの塩基配列を示す。16SrRNA、スペーサー、23SrRNAの各領域は既知配列との相同性から決定することができ、既知配列としては例えばヌクレック アシズ リサーチ (Nucleic Acids Re

search)、第10巻、第1607~1624頁(1982)に記載のパチルス ズブチリスのものが知られている。このようにして、配列表の配列番号3で表されるULの塩基配列中の塩基番号1~21を16SrRNAをコードする領域、塩基番号22~395をスペーサー領域、塩基番号396~440を23SrRNAをコードする領域と決定し、同様に、配列表の配列番号4で表されるUSの塩基配列中の塩基番号1~21を16SrRNAをコードする領域、塩基番号22~188をスペーサー領域、塩基番号189~233を23SrRNAをコードする領域と決定した。なお、ULのスペーサー領域には、tRNAをコードする領域が2か所に導入されていた。

【0015】このようにして決定したスペーサー領域の塩基配列は、例えばDNASISシステム(宝酒造社)を用いて解析することができ、アコレプラズマに特異的な領域を検索することができる。

【0016】次に、特異的な領域の検出方法としては、サザンハイブリダイゼーション法等の遺伝子検出方法が良いが、PCR法が現在最も高感度でかつ簡便な方法である。PCR法に用いるプライマーとしては該領域にアニーリングできるものであれば良い。例えば配列表の配列番号5~9でそれぞれ表されるAF5、AF6、AF3、AR6、AR5の各プライマーが選定できる。例えば、AF5、AF6、AF3から選択されるプライマーと、AR6、AR5から選択されるプライマーの組合せでPCRを行うことができる。

【0017】また、特異性と検出感度を更に高めるために、ネステッドPCR法を用いることができる。ネステッドPCR法とは、まず、第1回目のPCR(ファーストPCR)を行い、次にその増幅領域内で別のプライマーセットをデザインし、それらをプライマーとして第2回目のPCR(セカンドPCR)を行う方法である。これによりファーストPCRで生じた非特異的増幅産物がセカンドPCRの鋳型になる可能性が排除されるので、特異性を高めることができる。また、ファーストPCRで目的物が検出に十分な量の増幅がなされなかった場合でも、セカンドPCRを行うことにより確実に検出することができる。例えば、ファーストPCRのプライマー対としてはAF5とAF6、又はAF6とAR6のプライマー対を用いることができ、セカンドPCRのプライマー対としてはAF3とAR5のプライマー対を用いることができる。

【0018】また、増幅後のアコレプラズマDNAの検出は、例えばアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、スポット法、サザンプロット法を用いて行うことができる。この場合は、増幅領域内でプローブDNAを選択すればよい。プローブとしては例えば増幅領域内でデザインしたプライマーセットにより増幅した産物を、標識化して使用することもできる。これに

より、高感度な検出が可能となる。

【0019】標識化の方法は放射性同位元素標識法に限らず、酵素標識、蛍光標識、ビオチン、アビジン系標識、ケミプローブ標識法等公知の方法なら何でもよい。実際選定されたプライマーを用い、アコレプラズマ由来の遺伝子のPCR反応を行うことができ、電気泳動法、サザンハイブリダイゼーション法等により高感度に検出することができる。

【0020】このようにアコレプラズマに特有の遺伝子領域が明らかになり、この領域を検出することによりアコレプラズマを高感度に検出することができる。PCR法の場合、アコレプラズマ感染細胞1個よりの検出が可能であり、アコレプラズマの早期検出が可能となり、汚染細胞、汚染動物等の管理が容易となった。

【0021】また、本発明に従って、アコレプラズマ特定DNA領域を増幅させるためのプライマー対をそろえてキットとしておくことにより、アコレプラズマの検出を簡便に行うことができる。また、キット中には増幅されたDNA領域を検出するためのプローブを入れてもよい。なお、キットに用いる試薬は溶液状でも良いし、凍結乾燥物でもよい。

【0022】以上PCR法を用いたアコレプラズマの高感度検出法について詳細に説明してきたが、本発明はPCR法に限定されるものではなく、特定の核酸及びその相補鎖を高感度に検出する方法はすべて本発明に含まれるものであり、例えばQ $\beta$ -レプリケース アンプリフィケーション システム [バイオ/テクノロジー(Bio/technology)、第6巻、第1197頁(1988)] による方法が挙げられる。

30 【0023】

【実施例】以下本発明を実施例をもって詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

#### 【0024】実施例1

アコレプラズマの16SrRNA-スペーサー領域-23SrRNAをコードしているDNA領域の塩基配列決定

##### (1) アコレプラズマDNAの調製

培養細胞に高頻度で汚染するアコレプラズマ ライドラウイイ PG8株(東大医学部動物実験施設より分与)を公知の改良したエドワード(Edward)培地3リットルを用いて、37℃で培養し、10000g、1時間遠心して培地を除いた。TE緩衝液[10mMトリス(Tris)-HCl、pH7.5、1mMEDTA]で菌体を洗浄後、ラジン(Razin)らの方法[インターナショナル ジャーナルオブ システマチック バクテリオロジー(International Journal of Systematic Bacteriology)、第33巻、第201~206頁(1983)]でアコレプラズマDNAを調製した。

50 【0025】(2) オリゴヌクレオチド プライマーD

## NAの合成及び精製

配列表の配列番号1で表されるR16-2、配列表の配列番号2で表されるR23-1Rの各オリゴヌクレオチドプライマーDNAをDNA合成機（アプライドバイオシステムズ社）を用いて合成し、脱保護の後、イオン交換HPLC（TSKゲル、DEAE-2SW、東ソー社）で精製し、セブパック（Sep-Pack）C18（ウォーターズ社）で脱塩し、各DNAを約50 $\mu$ g得た。

【0026】（3）PCR法によるスパーサー領域の増幅

実施例1-（1）で調製したゲノムDNA0.1 $\mu$ gを0.5ml用チューブ（パイオビック社）に取り、94 $^{\circ}$ C、10分間加熱処理した後、ジーンアンプキット（Gene Amp Kit）（宝酒造社）中の10 $\mu$ lの10 $\times$ 増幅用バッファー〔100mMトリス-HCl、（pH8.3）、500mM KCl、15mM MgCl<sub>2</sub>、0.1%（W/V）ゼラチン〕、16 $\mu$ lの1.25mM dNTP混合液（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）、0.5 $\mu$ lの5ユニット/ $\mu$ lのタッカーポリメラーゼ、1 $\mu$ lの20 $\mu$ M R16-2プライマー、1 $\mu$ lの20 $\mu$ M R23-1Rプライマーを加え、これに滅菌水を加えて100 $\mu$ lの溶液にした。この反応液は上層に100 $\mu$ lのミネラルオイル（シグマ社）を加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー（宝酒造社）により増幅反応を行った。反応条件は、94 $^{\circ}$ C、0.5分間の変性 $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C、2分間のプライマーのアニーリング $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C、2分間の合成反応のサイクルを30サイクル行った。反応後10 $\mu$ lの反応液を取り、ヌシーブ（Nusieve）3:1アガロース（FMC社）ゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。その結果、約440bpと約230bpのDNAが増幅されており、該DNA断片をそれぞれUL、USと命名した。

【0027】（4）スパーサー領域のクローニング及びシーケンシング

実施例1-（3）で得られた増幅DNA反応液200 $\mu$ lを200 $\mu$ lのフェノール/クロロホルム（等量混合液）を加え緩やかに混合し、12000rpm、10分間遠心し水層（上層）を回収した。次に、200 $\mu$ lのクロロホルムを加え緩やかに混合し、12000rpm、10分間遠心し水層（上層）を回収した。最後に、20 $\mu$ lの3M酢酸ナトリウムと400 $\mu$ lのエタノールを加え、12000rpm、10分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は80%エタノールにて洗浄し、乾燥後、30 $\mu$ lのTEバッファーに溶解した。このDNA溶液を、1%シーブラック（Sea Plaque）アガロースゲル（FMC社）電気泳動に供し、目的のDNAを切り出した。切り出したDNAを含むゲルは、MERmaid<sup>TM</sup>キット（パイオ101社）により精製してDNA溶液を得た。まず切り出したゲル（約0.2g）に、ハイソルトバイン

ディングソリューション（High salt binding solution）600 $\mu$ l、グラスホグ（glass fog）40 $\mu$ lを加えて10分間、よくかくはんし、12000rpm、5秒間遠心して上清を除去した。ハイソルトバインディングソリューション200 $\mu$ lで沈殿を洗浄し、12000rpm、5秒間遠心し、上清を除去した。エタノールウォッシュ（Ethanol wash）300 $\mu$ lで沈殿を洗浄し、2~3秒間よくかくはんし、軽く遠心した。エタノールウォッシュで洗浄する操作を2~3回繰返して、沈殿、乾燥後、40 $\mu$ lの滅菌水を加え、50 $^{\circ}$ C、5分間インキュベート後、12000rpm、1分間遠心し、上清のDNA溶液を回収した。滅菌水でDNAを溶出する操作を後1~2回繰返した。最後に、10 $\mu$ lの3M酢酸ナトリウムと200 $\mu$ lのエタノールを加え、12000rpm、10分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は80%エタノールにて洗浄し、乾燥後、20 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。

【0028】このようにして得られたDNAを鋳型としてシークエナーゼ（Sequenase）シーケンシングキット（USB社）を用いて以下のようにダイレクトシーケンス法によるDNA塩基配列決定を行った。PCRによるDNA増幅に用いたプライマーR16-2、及びプライマーR23-1Rをメガラベル（MEGALABEL）キット（宝酒造社）を用いて、5'末端を〔 $\gamma$ -<sup>32</sup>P〕dATPで放射性標識した。放射性標識したプライマーR16-2、あるいはR23-1R 20ng（4pmol）鋳型DNAを約0.5pmol、5 $\times$ 緩衝液2 $\mu$ lに滅菌水を加え、8 $\mu$ lにした後、94 $^{\circ}$ Cで30分間加熱し、氷中で急冷した。この反応液に1 $\mu$ lの0.1M DTT、2 $\mu$ lの1/6希釈ラベリングミックス、0.5 $\mu$ lの〔 $\alpha$ -<sup>32</sup>S〕dCTP、及び2 $\mu$ lの1/9希釈シークエナーゼを加え室温、5分間ラベリング反応を行った。あらかじめそれぞれ2.5 $\mu$ lのddGTP、ddATP、ddTTP、及びddCTPを加えた4本のチューブにそれぞれ3.5 $\mu$ lのラベリング反応液を加え37 $^{\circ}$ C、5分間ターミネーション反応を行った後、4 $\mu$ lの反応停止液を加えた。この反応液を6%ポリアクリルアミドゲル中で40ワット、1.5~3時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを乾燥し、X線フィルム（コダック社）によりオートラジオグラムを得た。オートラジオグラムより塩基配列を解析した。またダイレクトシーケンス法ではプライマー付近の塩基配列が得られないため、プライマー付近のみ目的のDNA断片をM13mp18RF DNA（宝酒造社）にクローニングしてシーケンシングを行った。

【0029】以上のようにして配列表の配列番号3及び4でそれぞれ表されるUL及びUSの塩基配列を決定した。更に、既知配列との相同性から16SrRNAをコードする領域、スパーサー領域、23SrRNAをコードする領域を決定した。なお、ULのスパーサー領域に

はtRNAをコードする領域が挿入されていた。

### 【0030】実施例2

#### PCR法によるアコレプラズマの検出

(1) アコレプラズマ検出のためのプライマーの選定と合成

実施例1-(4)で得られた塩基配列を基に、DNASISシステム(宝酒造社)を用いてアコレプラズマに特異的な配列を解析し、配列表の配列番号5~9でそれぞれ表される特異的プライマーAF5、AF6、AF3、AR6、AR5を選定した。これらのプライマーを実施例1-(2)と同様の方法で合成及び精製した。

【0031】(2) 特異的プライマーを用いたPCR法によるアコレプラズマDNAの増幅

実施例1-(1)で得たアコレプラズマ ライドラウイゲノムDNAを鋳型に用いて、実施例1-(3)の方法でPCR法による増幅、検出を行った。プライマーとして、それぞれ1μlの20μM、AF5とAR6、AF6とAR6、AF3とAR5を用いた。

【0032】その結果、AF5とAR6のプライマー対より389bpと182bp、AF6とAR6より、312bp、AF3とAR5より247bpのアコレプラズマの遺伝子を特異的に増幅することができた。しかし、7種類のマイコプラズマ〔マイコプラズマ ホミニス(M. hominis)、マイコプラズマ アルスリティディス(M. arthritidis)、マイコプラズマ ハイオリニス(M. hyorhinis)、マイコプラズマ プルモニス(M. pulmonis)、マイコプラズマ ニューロリティカム(M. neurolyticum)、マイコプラズマ サリバニウム(M. salivalium)、マイコプラズマ アルギニニ(M. arginini)〕、マウス、及び大腸菌のDNAを鋳型とした反応溶液では、バンドは認められなかった。

### 【0033】実施例3

#### ネステッドPCRによるアコレプラズマDNAの検出

(1) 実施例2-(2)で、プライマー対としてプライ \*

表3 アコレプラズマ増幅・検出キット

キットI	A剤	アコレプラズマプライマー液	20μl (1μl×20回分)
キットII	B剤	アコレプラズマプライマー液	20μl (1μl×20回分)
キットIII	A剤	アコレプラズマプライマー液	20μl (1μl×20回分)
	B剤	アコレプラズマプライマー液	20μl (1μl×20回分)

### 【0037】

【発明の効果】以上詳細に説明したように、本発明によりアコレプラズマの16S/23SrRNAスペーサー領域の塩基配列が明らかになり、このスペーサー領域の塩基配列を用いたアコレプラズマの迅速、かつ高感度な検出方法が提供された。

#### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

\* マーAF5とAR6、あるいはAF6とAR6を用いて反応を行った反応溶液1μlを鋳型として、実施例1-(3)の方法でPCR法による増幅、検出を行った。プライマーとしてそれぞれ1μlの20μM AF3とAR5を用いた。この結果、247bpのバンドが増幅されたが、7種類のマイコプラズマDNA、マウスDNA、大腸菌DNAを鋳型とした反応溶液ではバンドは認められなかった。

### 【0034】実施例4

#### 10 夾雑DNAの影響と検出感度

ヒトゲノムDNA中に、アコレプラズマDNAを混合し、そのDNA溶液からアコレプラズマのDNAのみを特異的に、かつ効率よく増幅するかどうかを検討した。ヒトゲノムDNA100ngに対して、アコレプラズマDNAを1ng、0.1ng、0.01ng、0.001ng加えたサンプルを用意した。これらを鋳型とし、AF5とAR6をプライマーとして、実施例1-(3)と同様にPCR法による増幅、検出を行った。その結果、ヒトゲノムDNAの有無に関係なく、アコレプラズマDNAが0.001ngまで増幅、検出されることを確認した。

### 【0035】実施例5

#### アコレプラズマ検出キットの作成

試料中のアコレプラズマDNAを増幅、検出するためのキットを作成した。ファーストPCR用プライマーとして、プライマーAF6及びAR6が、各20μM溶液となるようにTE緩衝液20μlに溶解し、アコレプラズマプライマー液(A剤)とした。また、セカンドPCR用プライマーとしてプライマーAF3及びAR6が各20μM溶液となるように、TE緩衝液20μlに溶解し、アコレプラズマプライマー液(B剤)とした。A剤、B剤、及びA剤とB剤の組合せでキットI~IIIを作成した(表3)。

### 【0036】

#### 【表3】

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

配列：

GTGCGGCTGG ATCACCTCCT 20

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸(合成DNA)

※50 配列：



13

CYTACSGAAC CGTGATCCTC 20

配列番号: 3

配列の長さ: 440

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源:

生物名: アコレプラズマ ライドラウイイ (Acholepla  
sma laidlawii)

配列:

```

GGCTGGATCA CCTCCTTTCT AAGGAGAAAG GCTAACTAAC ACTTAGCACA AGATGACTAC 60
TAGTAAGTAG TAACATTCTC TAAATTGTGTT CATCATATTC AGTTTGTAGA GACTTAAATG 120
TCACTCAAAC AAGTAACCAC ATATTAATAA TAAGTGGGGC CTGTAGCTCA GTTGGTTAGA 180
GCACTCGCTT GATAAGCGAG GGGTCGATGG TTCAAGTCGT TCAGGCCAC CATTAATAAA 240
TATCAATAAA AATTGGGCCT TAGCTCAGCT GGGAGAGCGC CTGCCTTGCA CGCAGGAGGT 300
CAGCGGTTTC ATCCGCTAGG CTCCACCAAT ATAAAATTAG GGTAACCTAA TTGAGATCTT 360
TGAAAAGTAG ATAAATGATG TCTGAAAAGA AATAAGGTTA AGGAACAAAG GGCACACAGT 420
GGATGCCTTG GCACTAGGAG
440

```

配列番号: 4

配列の長さ: 233

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源:

配列:

```

GGCTGGATCA CCTCCTTTCT AAGGAGAAAG GCTAACTAAC ACTTAGCACA AGATGACTAC 60
TAGTAAGTAG TAATATTCTC TAAATTGTGTT CATCATATTC AGTTTGTAAA GACTTAAAGT 120
AATTTAAGTG TTTCAAGAAG TAAAGAAAGT CTTTGAAAAG TAGATAAATG ATGTCTGAAA 180
AGAAATAAGG TTAAGGAACA AAGGGCACAC AGTGGATGCC TTGCACTAG GAG 233

```

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

CTAACTAACA CTTAGCACAA 20

配列番号: 6

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

GAGACTTAAA TGCTACTCAA 20

配列番号: 7

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

14

\* 株名: PG8

配列の特徴:

1-21 16SrRNAをコードする領域

22-156 スペーサー領域

157-232 tRNAをコードする領域

233-254 スペーサー領域

255-328 tRNAをコードする領域

329-395 スペーサー領域

396-440 23SrRNA をコードする領域

\* 10

※ 生物名: アコレプラズマ ライドラウイイ (Acholepla  
sma laidlawii)

株名: PG8

配列の特徴:

1-21 16SrRNAをコードする領域

22-188 スペーサー領域

※ 188-233 23SrRNAをコードする領域

★ 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

GTCCTCAA CAAGTAACCA 20

配列番号: 8

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

40 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

配列:

ACTGTGTGCC CTTTGTTCCT 20

配列番号: 9

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

★ 50 配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

(9)

特開平6-98800

15

16

配列:

\* \* TTTCAAAGAT CTCAATTAGG 20

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

/(C 1 2 Q 1/04

C 1 2 R 1:01)

(72) 発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造  
株式会社中央研究所内

※ (72) 発明者 原澤 亮

東京都足立区六月3-9-12

※